

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/78963 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/15,
C07K 14/81, A61K 38/57, 48/00, C07K 16/38, C12N
15/11, G01N 33/68, A61K 31/70, 39/395

STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25,
D-30625 Hannover (DE). KREUTZMANN, Peter
[DE/DE]; Rautenbreite 11, D-39116 Magdeburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04331

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler
Seling Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Juni 1999 (22.06.1999)

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE];
Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÄGERT, Hans-Jür-
gen [DE/DE]; Moltkeplatz 8, D-30163 Hannover (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 00/78963 A1

(54) Title: SERIN PROTEINASE INHIBITORS

(54) Bezeichnung: SERIN-PROTEINASE-INHIBITOREN

(57) Abstract: The invention relates to serin proteinase inhibitors having the amino acid sequence in accordance with Seq. ID Nr. 1.

(57) Zusammenfassung: Serin-Proteinase-Inhibitor, mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 1.

Serin-Proteinase-Inhibitoren

Die Erfindung betrifft Serin-Proteinase-Inhibitoren, cDNA kodierend für Serin-Proteinase-Inhibitoren, Arzneimittel enthaltend die Inhibitoren oder deren codierende Nucleinsäure, Verwendungen der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung verschiedener Indikationen, Antikörper- oder Antikörperfragmente gegen Epitope der erfindungsgemäßen Verbindungen, Poly- oder Oligonucleotide, die mit Genen der erfindungsgemäßen Verbindungen hybridisieren, ein Diagnostikum zum Aufspüren der erfindungsgemäßen Verbindungen, sowie Arzneimittel enthaltend Antikörper oder Poly- oder Oligonucleotide gemäß der Erfindung.

Proteolytische Prozesse spielen in allen Organismen eine bedeutende physiologische Rolle, wobei zwischen unspezifischen und spezifischen proteolytischen Reaktionen zu unterscheiden ist. Zu den ersten gehören beispielsweise der Nahrungsaufschluß im Verdauungstrakt durch Endopeptidasen sowie der intrazelluläre Abbau verbrauchter endogener Substanzen und phagozytierten Materials durch lysosomale Proteinase. Spezifische Proteolysen dienen meistens der Überführung eines Proenzym in die aktive Form wie bei der Überführung von Trypsinogen in Trypsin und Chymotrypsinogen in Chymotrypsin sowie bei den Kallikrein-Kinin-Kaskaden und der Blutgerinnungskaskade. Je nach Beschaffenheit des reaktiven Zentrums der daran beteiligten Proteinase werden diese in die Klassen der Serin-Proteinase (z.B. Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Kathepsin G), der Aspartat-Proteinase (z.B. Kathepsin D, Kathepsin E und Pepsin), der Cystein-Proteinase (z.B. Kathepsin B, Kathepsin H und Kathepsin L) und der Metallo-Proteinase (z.B. Kollagenase und Thermolysin) unterteilt.

Um die oft kaskadenartig verlaufenden proteolytischen Prozesse gegenregulieren zu können, verfügt der Organismus über eine Reihe von anderen Proteinen, den Proteinase-Inhibitoren (zur Übersicht siehe Laskowski und Kato, 1980 und Bode und Huber, 1992). So schützen die in der Leber synthetisierten, humanen Plasma-Proteinase-Inhibitoren α_1 -Antichymotrypsin und α_1 -Proteinase-Inhibitoren das Lungengewebe vor unspezifischem Angriff durch die Proteinasen Kathepsin G bzw. Elastase aus polymorphkernigen Lymphozyten. Bei einem Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und ihren spezifischen Inhibitoren kann es zum Auftreten pathologischer Effekte kommen. Ein übermäßiges Verhältnis von Elastase zu α_1 -Proteinase-Inhibitor erhöht beispielsweise bei Patienten mit genetisch bedingtem Mangel an diesem Faktor das Risiko der Bildung eines Lungenemphysems um ca. 20 bis 30fach gegenüber der Normalbevölkerung (Carrel und Owen, 1980). Bei Rauchern wird die Emphysembildung mittels Oxidation der im reaktiven Zentrum des α_1 -Proteinase-Inhibitors befindlichen Aminosäure Methionin durch im Zigarettenrauch enthaltene Oxidantien begünstigt (Miller und Kuschner, 1969; Ohlsson et al., 1980). Auch im Falle der Infektion mit Gram-negativen Bakterien können deren Endotoxine eine Desintegration von Phagozyten und damit die Ausschüttung lysosomaler Proteinasen verursachen, was durch den erhöhten Verbrauch an Proteinase-Inhibitoren unkontrollierte Gewebsschädigung und Entzündungen verursachen kann. Aus diesem Grund besitzen bestimmte Proteinase-Inhibitoren ein hohes therapeutisches Potential (siehe z.B. Fritz, 1980).

Die internationale Anmeldung PCT/EP 98/08424 betrifft Serin-Proteinase-Inhibitoren, wobei diese Serin-Proteinase-Inhibitoren eine Domäne mit vier Cysteinen aufweisen und sich zwischen dem ersten und einem zweiten Cystein eine Sequenz von 0 bis 20 Aminosäuren befindet oder die Serin-Proteinase-Inhibitoren eine Domäne mit sechs Cysteinen aufweisen und sich zwischen dem ersten und zweiten Cystein eine Sequenz von 7 bis 20 Aminosäuren befindet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weitere Serin-Proteinase-Inhibitoren bereitzustellen.

Gelöst wird die Aufgabe durch einen Serin-Proteinase-Inhibitor mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 1.

Auch Fragmente des erfindungsgemäßen Serin-Proteinase-Inhibitors mit der Aminosäuresequenz R_1 -X- R_2 sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung, wobei R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren ist und R_2 $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren ist und X ausgewählt wird aus Seq. ID Nr. 2 bis 6

Es ist bevorzugt, daß der Serin-Proteinase-Inhibitor ein oder mehrere Disulfidbrücken aufweist. Dabei ist besonders bevorzugt, daß er zwischen dem ersten und vierten Cystein und/oder dem zweiten und dritten Cystein eine Disulfidbrücke aufweist oder daß er zwischen dem ersten und fünften Cystein und/oder dem zweiten und vierten Cystein und/oder dem dritten und sechsten Cystein eine Disulfidbrücke aufweist.

Aus Figur 1 läßt sich neben der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäß bevorzugten Verbindungen auch weitere Informationen bezüglich der cDNA, die für die erfindungsgemäßen Verbindungen kodiert, entnehmen. Insbesondere werden die entsprechenden Motive und Primer hybridisierenden Stellen angegeben.

Erfindungsgemäß beansprucht werden auch Nucleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Verbindungen kodieren, insbesondere DNA mit der Nucleinsäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 7 bis 12.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind als Arzneimittel geeignet. Gegebenenfalls werden sie zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen appliziert.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthaltend die erfindungsgemäßen Proteinase-Inhibitoren werden vorzugsweise in Mengen von 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht des Patienten verabreicht. Als Verabreichungsform kommen alle galenischen Zubereitungen für Peptidwirkstoffe in Frage. Die Arzneimittel enthaltend Nucleinsäuren gemäß der Erfindung werden vorzugsweise in Mengen von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht eines entsprechenden Patienten verabreicht. Hier kommen als galenische Verabreichungsformen solche in Betracht, die zur Applikation von Nucleinsäuren geeignet sind, ohne daß die Nucleinsäuren vor Erreichen des Wirkortes durch Stoffwechseleinflüsse unwirksam gemacht werden. Als galenische Verabreichungsform können z.B. Liposomen eingesetzt werden, in denen die Nucleinsäuren befindlich sind.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen kommen insbesondere zur Behandlung von akuten oder chronischen Cervixentzündungen, Entzündungen der Bartholinschen Drüsen oder anderer vaginaler Bereiche, Tonsillitis, Pharyngitis und Laryngitis, mit exzessiver Schleimbildung verbundener akut oder chronisch entzündlicher Prozesse und sich daraus ergebender akuter Notsituationen, postoperativer Blutungen aufgrund Hyperfibrinolyse sowie zur Prophylaxe der Lungenemphysembildung bei α_1 -Proteinase-Inhibitormangel in Betracht.

Desweiteren können sie zur Therapie von Asthma, Aids, Tumorerkrankungen und Leukämie eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können bei Mangel an Serin-Proteinase-Inhibitoren verabreicht werden, um endogene Defizite auszugleichen. Die Nucleinsäuren können, direkt oder an geeignete Vehikel gekoppelt, auch zum Einsatz in der Gentherapie gelangen. Als geeignete Vektoren kommen insbesondere attenuierte Adenoviren, in die entsprechenden Gene inkorporiert werden, in Frage.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können zur Herstellung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten dienen. Diese werden in einfacher Weise durch Immunisierung geeigneter Säuger hergestellt. Durch an sich bekannte Operationen können die Antikörper auch humanisiert werden, so daß diese Antikörper ebenfalls zum therapeutischen Einsatz gelangen können. Antikörper oder Antikörperfragmente können dann zur Regulation von Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen die Proteinase-Inhibitoren pathologisch exprimiert werden. Ebenso können zu den erfindungsgemäßen Nucleinsäuren komplementäre Antisense-Nucleinsäuren zum therapeutischen Einsatz bei Überexpression der Proteinase-Inhibitor-Genen eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in einfacher Weise durch an sich bekannte Methoden der Peptid- bzw. Nucleotidsynthese herstellbar. Einer gentechnischen Herstellung der Verbindungen steht ebenfalls nichts im Wege.

Der Fachmann erkennt, daß bei den Polypeptiden gemäß der Erfindung auch Fragmente verwendet werden können, sofern sie die inhibitorischen Eigenschaften der Serin-Proteinase-Inhibitoren beibehalten. Das Auffinden solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. So erfolgt dies beispielsweise durch gezielte enzymatische Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Es können auch in den Seitenketten modifizierte Aminosäuren eingesetzt werden. Auch N- und C-terminal modifizierte Polypeptide kommen in Betracht. Insbesondere können phosphorylierte, glycosylierte, methylierte, acetylierte oder in ähnlicher Weise modifizierte Polypeptide eingesetzt werden, sofern sie die Wirkung der Serin-Proteinase-Inhibitoren nicht relevant beeinträchtigen.

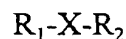
Bei den Nucleinsäuren gemäß der Erfindung kommen auch Derivate in Betracht, die je nach Codon Usage modifizierte Tripletstrukturen aufweisen. Desweiteren sind als Nucleinsäuren gemäß der Erfindung auch solche zu verstehen, die durch Nucleasen

gegenüber den nativen Verbindungen weniger stark abgebaut werden, beispielsweise die entsprechenden SODN-Derivate, die in der Antisense-Technologie üblicherweise eingesetzt werden, um die Antisense-Strukturen gegenüber enzymatischen Angriffen stabiler auszugestalten.

Auch mit den Polypeptiden homologe Strukturen kommen in Betracht. Dies sind insbesondere Polypeptidstrukturen, bei denen Aminosäuren ausgetauscht sind. So können beispielsweise konservative Aminosäuresubstitutionen in hochkonservierten Regionen wie folgt berücksichtigt werden: Jede Isoleucin-, Valin- und Leucin-Aminosäure kann gegen eine andere dieser Aminosäuren ausgetauscht sein, Aspartat kann gegen Glutamat und umgekehrt ausgetauscht sein, Glutamin gegen Asparagin und umgekehrt, Serin gegen Threonin und umgekehrt. Konservative Aminosäuresubstitutionen in weniger hochkonservierten Regionen können wie folgt sein: Jede der Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin gegen jede andere Aminosäuren, Aspartat gegen Glutamat und umgekehrt, Glutamin gegen Asparagin und umgekehrt, Serin gegen Threonin und umgekehrt, Glycin gegen Alanin und umgekehrt, Alanin gegen Valin und umgekehrt, Methionin gegen jede der Aminosäuren Leucin, Isoleucin oder Valin, Lysin gegen Arginin und umgekehrt, eine der Aminosäuren Aspartat oder Glutamat gegen eine der Aminosäuren Arginin oder Lysin, Histidin gegen eine der Aminosäuren Arginin oder Lysin, Glutamin gegen Glutamat und umgekehrt und Asparagin gegen Aspartat und umgekehrt.

Patentansprüche

1. Serin-Proteinase-Inhibitor, mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 1.
2. Fragment des Serin-Proteinase-Inhibitors mit der Aminosäuresequenz



worin R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren ist und R_2 $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren ist und X ausgewählt wird aus Seq. ID Nr. 2 bis 6.

3. Nucleinsäure kodierend für einen Serin-Proteinase-Inhibitor gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, insbesondere Seq. ID Nr. 7 bis 12.
4. Arzneimittel enthaltend mindestens einen Serin-Proteinase-Inhibitor gemäß Anspruch 1 oder 2 und/oder eine Nucleinsäure gemäß Anspruch 3 gegebenenfalls mit pharmazeutischen Trägerstoffen.
5. Arzneimittel nach Anspruch 4, enthaltend 0,01 bis 1.000 mg/kg Körpergewicht des Serin-Proteinase-Inhibitors nach Anspruch 1 oder 2 und/oder der Nucleinsäure gemäß Anspruch 3.
6. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von akuten oder chronischen Cervixentzündungen, Entzündungen der Bartholinschen Drüsen und anderer vaginaler Bereiche, Tonsillitis, Pharyngitis und Laryngitis, mit exzessiver Schleimbildung verbundener akut oder chronisch entzündlicher Prozesse und sich daraus ergebender akuter Not-situa-

tionen, postoperativer Blutungen aufgrund Hyperfibrinolyse sowie zur Prophylaxe der Lungenemphysembildung bei α_1 -Proteinase-Inhibitormangel.

7. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 4 zur Therapie von Asthma, Aids, Lungenentzündung, Tumorerkrankungen und Leukämie.
8. Verwendung der Nucleinsäuren gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz in der Gentherapie zur Heilung und Prophylaxe von Erkrankungen gemäß Anspruch 6.
9. Antikörper oder Antikörper-Fragmente gegen Epitope der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 oder 2.
10. Poly- oder Oligonucleotide, die mit Bereichen der cDNA oder entsprechender RNA unter stringenten Bedingungen hybridisieren und gegebenenfalls die Expression codierender Bereiche der für die Verbindungen nach Ansprüchen 1 oder 2 codierenden Gene verhindern (Antisense Verbindungen).
11. Diagnostikum enthaltend mindestens eine der Verbindungen gemäß Anspruch 9 oder 10.
12. Arzneimittel enthaltend mindestens eine der in den Ansprüchen 9 und/oder 10 genannten Verbindungen in therapeutisch wirksamen Mengen.
13. Verwendung der Verbindungen gemäß Anspruch 9 und/oder 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer zu hohen Expression der Verbindungen gemäß Anspruch 1 oder 2 oder zu hohen Aktivität der für die Verbindungen gemäß Ansprüchen 1 oder 2 codierenden Bereichen verbunden sind.

14. DNA kodierend für die in den Ansprüchen 1 oder 2 genannten Verbindungen und/oder RNA, die in der Transcription oder Translation der in den Ansprüchen 1 oder 2 genannten Verbindungen beteiligt ist.

Figur 1

Frame 2

ATG CAT GGA GTG GAC CTG TAG GCG ACT TGC ATC GTC TTC AAC ATG AAG ATA GCC

10 19 28 37 46 55

M K I A

T V S V L L P L A L C L I Q D A A S K N

ACA GTG TCA GTG CTT CTG CCC TTG GCT CTT TGC CTC ATA CAA GAT GCT GCC AGT AAG AAT

64 73 82 91 100 109

HF 6479

Repeat 1

E D Q E M C H E F Q A F M K N G K L F C

GAA GAT CAG GAA ATG TGC CAT GAA TTT CAG GCA TTT ATG AAA AAT GGA AAA CTG TTC TGT

124 133 142 151 160 169

P Q D K K F F Q S L D G I M F I N K C A

CCC CAG GAT AAG AAA TTT TTT CAA AGT CTT GAT GGA ATA ATG TTC ATC AAT AAA TGT GCC

164 193 202 211 220 229

HF 6479

T C K M I L E K E A K S C Q K R A R H L A

ACG TGC AAA ATG ATA CTG GAA AAA GAA GCA AAA TCA CAG AAG AGG GCC AGG CAT TTA GCA

244 253 262 271 280 289

Typische Kazal-Domäne 1

R A P K A T A P T E L N C D D F K K G E

AGA GCT CCC AAG GCT ACT GCC CCA ACA GAG CTG AAT TGT GAT GAT TTT AAA AAA GGA GAA

304 313 322 331 340 349

R D G D F I C P D Y Y E A V C G T D G K

AGA GAT GGG GAT TTT ATC TGT CCT GAT TAT TAT GAA GCT GTT TGT GGC ACA GAT GGG AAA

364 373 382 391 400 409

T Y D N R C A L C A E N A K T G S Q I G

ACA TAT GAC AAC AGA TGT GCA CTG TGT GCT GAG AAT GCG AAA ACC GGG TCC CAA ATT GGT

424 433 442 451 460 469

Repeat 2

V K S E G E C K S S N P E Q D V C S A F

GTA AAA AGT GAA GGG GAA TGT AAG AGC AGT AAT CCA GAG CAG GAT GTA TGC AGT GCT TTT

484 493 502 511 520 529

R P F V R D G R L G C T R E N D P V L G

CGG CCC TTT GTT AGA GAT GGA AGA CTT GGA TGC ACA AGG GAA AAT GAT CCT GTT CTT GGT

544 553 562 571 580 589

P D G K T H G N K C A M C A E G L F L K E

CCT GAT GGG AAG ACG CAT GGC AAT AAG TGT GCA ATG TGT GCT GAG CTG TTT TTA AAA GAA

604 613 622 631 640 649

A E N A K R E G E T R I R R N A E K D F

GCT GAA AAT GCC AAG CGA GAG GGT GAA ACT AGA ATT CGA CGA AAT GCT GAA AAG GAT TTT

664 673 682 691 700 709

Repeat 3

C K E Y E K Q V R N G R L F C T R E S D

TGC AAG GAA TAT GAA AAA CAA GTG AGA AAT GGA AGG CTT TTT TGT ACA CGG GAG AGT GAT

724 733 742 751 760 769

P V R G P D G R M H G N K C A L C T A E I

CCA GTC CGT GGC CCT GAC GGC AGG ATG CAT GGC AAC AAA TGT GCC CTG TGT GCT GAA ATT

784 793 802 811 820 829

F K R R F S E E N S K T D Q N L G K A E

TTC AAG CGG CGT TTT TCA GAG GAA AAC AGT AAA ACA GAT CAA AAT TTG GGA AAA GCT GAA

844 853 862 871 880 889

Repeat 4

E K T K V K R E I V K L C S Q Y Q N Q A

GAA AAA ACT AAA GTT AAA AGA GAA ATT GTG AAA CTC TGC AGT CAA TAT CAA AAT CAG GCA

904 913 922 931 940 949

- 2/4 -

K N G I L F C T R E N D P I R G P D G K
AAG AAT GGA ATA CTT TTC TGT ACC AGA GAA AAT GAC CCT ATT CGT GGT CCA GAT GGG AAA
964 973 982 991 1000 1009

M H G N L C S M C Q V Y F Q A E N E E K
ATG CAT GGC AAC TTG TGT TCC ATG TGT CAA GTC TAC TTC CAA GCA GAA AAT GAA GAA AAG
1024 1033 1042 1051 1060 1069

HF 7665
K K A E A R A R N K R E S G K A T S Y A
AAA AAG GCT GAA GCA CGA GCT AGA AAC AAA AGA GAA TCT GGA AAA GCA ACC TCA TAT GCA
1084 1093 1102 1111 1120 1129

Repeat 5

E L C N E Y R K L V R N G K L A C T R E
GAG CTT TGC AAT GAA TAT CGA AAG CTT GTG AGG AAC GGA AAA CTT GCT TGC ACC AGA GAG
1144 1153 1162 1171 1180 1189

N D P I Q G P D G K V H G N T C S M C E
AAC GAT CCT ATC CAG GGC CCA GAT GGG AAA GTG CAC GGC AAC ACC TGC TCC ATG TGT GAG
1204 1213 1222 1231 1240 1249

HF 7665
V F F Q A E E E E K K K K E G E S R N K
GTC TTC TTT CAA GCA GAA GAA GAA AAG AAA AAG GAA GGC GAA TCA AGA AAC AAA
1264 1273 1282 1291 1300 1309

Repeat 6

R Q S K S T A S F E E L C S E Y R K S R
AGA CAA TCT AAG AGT ACA GCT TCC TTT GAG GAG TTG TGT AGT GAA TAC CGC AAA TCC AGG
1324 1333 1342 1351 1360 1369

K N G R L F C T R E N D P I Q G P D G K
AAA AAC GGA CGG CTT TTT TGC ACC AGA GAG AAT GAC CCC ATC CAG GGC CCA GAT GGG AAA
1384 1393 1402 1411 1420 1429

M H G N T C S M C E A F F Q Q E E R A R
ATG CAT GGC AAC ACC TGC TCC ATG TGT GAG GCC TTC TTT CAA CAA GAA GAA AGA GCA AGA
1444 1453 1462 1471 1480 1489

Repeat 7

A K A K R E A A K E I C S E F R D Q V R
GCA AAG GCT AAA AGA GAA GCT GCA AAG GAA ATC TGC AGT GAA TTT CGG GAC CAA GTG AGG
1504 1513 1522 1531 1540 1549

N G T L I C T R E H N P V R G P D G K M
AAT GGA ACA CTT ATA TGC ACC AGG GAG CAT AAT CCT GTC CGT GGA CCA GAT GGC AAA ATG
1564 1573 1582 1591 1600 1609

H G N K C A M C A S V F K L E E E E K K
CAT GGA AAC AAG TGT GCC ATG TGT GCC AGT GTG TTC AAA CTT GAA GAA GAA GAG AAG AAA
1624 1633 1642 1651 1660 1669

N D K E E K G K V E A E K V K R E A V Q
AAT GAT AAA GAA GAA AAA GGG AAA GTT GAG GCT GAA AAA GTT AAG AGA GAA GCA GTT CAG
1684 1693 1702 1711 1720 1729

Repeat 8

E L C S E Y R H Y V R N G R L P C T R E
GAG CTG TGC AGT GAA TAT CGT CAT TAT GTG AGG AAT GGA CGA CTC CCC TGT ACC AGA GAG
1744 1753 1762 1771 1780 1789

N D P I E G L D G K I H G N T C S M C E
AAT GAT CCT ATT GAG GGT CTA GAT GGG AAA ATC CAC GGC AAC ACC TGC TCC ATG TGT GAA
1804 1813 1822 1831 1840 1849

A F F Q Q E A K E K E R A E P R A K V K
GCC TTC TTT CAG CAA GAA GCA AAA GAA AAA GAA GAA GCT GAA CCC AGA GCA AAA GTC AAA
1864 1873 1882 1891 1900 1909

Repeat 9

R E A E K E T C D E F R R L L Q N G K L

- 3/4 -

AGA GAA GCT GAA AAG GAG ACA TGC GAT GAA TTT CGG AGA CTT TTG CAA AAT GGA AAA CTT
 1924 1933 1942 1951 1960 1969

 F C T R E N D P V R G P D G K T H G N K
 TTC TGC ACA AGA GAA AAT GAT CCT GTG CGT GGC CCA GAT GGC AAG ACC CAT GGC AAC AAG
 1984 1993 2002 2011 2020 2029

 C A M C K A V F Q K E N E E R K R K E E
 TGT GCC ATG TGT AAG GCA GTC TTC CAG AAA GAA AAT GAG GAA AGA AAG AGG AAA GAA GAG
 2044 2053 2062 2071 2080 2089

E D Q R N A A G H G S S G G G G G N T Q
 GAA GAT CAG AGA AAT GCT GCA GGA CAT GGT TCC AGT GGT GGT GGA GGA GGA AAC ACT CAG
 2104 2113 2122 2131 2140 2149

Repeat 10

 D E C A E Y Q E Q M K N G R L S C T R E
 GAC GAA TGT GCT GAG TAT CAG GAA CAA ATG AAA AAT GGA AGA CTC AGC TGT ACT CGG GAG
 2164 2173 2182 2191 2200 2209

 S D P V R D A D G K S Y N N Q C T M C K
 AGT GAT CCT GTA CGT GAT GCT GAT GGC AAA TCG TAC AAC AAT CAG TGT ACC ATG TGT AAA
 2224 2233 2242 2251 2260 2269

A K L E R E A E R K N E Y S R S R S N G
 GCA AAA TTG GAA AGA GAA GCA GAG AGA AAA AAT GAG TAT TCT CGC TCC AGA TCA AAT GGG
 2284 2293 2302 2311 2320 2329

Repeat 11

 T G S E S G K D T C D E F R S Q M K N G
 ACT GGA TCA GAA TCA GGG AAG GAT ACA TGT GAT GAG TTT AGA AGC CAA ATG AAA AAT GGA
 2344 2353 2362 2371 2380 2389

 K L I C T R E S D P V R G P D G K T H G
 AAA CTT ATC TGC ACT CGA GAA AGT GAC CCT GTC CGG GGT CCA GAT GGC AAG ACA CAT GGT
 2404 2413 2422 2431 2440 2449

 N K C T M C K E K L E R E A A E K K K K
 AAT AAG TGT ACT ATG TGT AAG GAA AAA CTG GAA AGG GAA GCA GCT GAA AAA AAA AAG AAA
 2464 2473 2482 2491 2500 2509

E D E D R S N T G E R S N T G E R S N D
 GAG GAT GAA GAC AGG AGC AAT ACA GGA GAA AGG AGC AAT ACA GGA GAA AGG AGC AAT GAC
 2524 2533 2542 2551 2560 2569

Repeat 12

 K E D L C R E F R S M Q R N G K L I C T
 AAA GAG GAT CTG TGT CGT GAA TTT CGA AGC ATG CAG AGA AAT GGA AAG CTT ATC TGC ACC
 2584 2593 2602 2611 2620 2629

 R E N N P V R G P Y G K M H I N K C A M
 AGA GAA AAT AAC CCT GTT CGA GGC CCA TAT GGC AAG ATG CAC ATC AAT AAA TGT GCT ATG
 2644 2653 2662 2671 2680 2689

 C Q S I F D R E A N E R K K K D E E K S
 TGT CAG AGC ATC TTT GAT CGA GAA GCT AAT GAA AGA AAA AAG AAA GAT GAA GAG AAA TCA
 2704 2713 2722 2731 2740 2749

Repeat 13

 S S K P S N N A K D E C S E F R N Y I R
 AGT AGC AAG CCC TCA AAT AAT GCA AAG GAT GAG TGC AGT GAA TTT CGA AAC TAT ATA AGG
 2764 2773 2782 2791 2800 2809

 N N E L I C P R E N D P V H G A D G K F
 AAC AAT GAA CTC ATC TGC CCT AGA GAG AAT GAC CCA GTG CAC GGT GCT GAT GGA AAG TTC
 2824 2833 2842 2851 2860 2869

 Y T N K C Y M C R A V F L T E A L E R A
 TAT ACA AAC AAG TGC TAC ATG TGC AGA GCT GTC TTT CTA ACA GAA GCT TTG GAA AGG GCA
 2884 2893 2902 2911 2920 2929

K L Q E K P S H V R A S Q E E D S P D S
 AAG CTT CAA GAA AAG CCA TCC CAT GTT AGA GCT TCT CAA GAG GAA GAC AGC CCA GAC TCT
 2944 2953 2962 2971 2980 2989

Typische Kazal-Domäne 2

- 4/4 -

```

      *
F   S   S   L   D   S   E   M   C   K   D   Y   R   V   L   P   R   I   G   Y
TTC AGT TCT CTG GAT TCT GAG ATG TGC AAA GAC TAC CGA GTA TTG CCC AGG ATA GGC TAT
      3004      3013      3022      3031      3040      3049

#
L   C   P   K   D   L   K   P   V   C   G   D   D   G   Q   T   Y   N   N   P
CTT TGT CCA AAG GAT TTA AAG CCT GTC TGT GGT GAC GAT GGC CAA ACC TAC AAC AAT CCT
      3064      3073      3082      3091      3100      3109

#
C   M   L   C   H   E   N   L   I   R   Q   T   N   T   H   I   R   S   T   G
TGC ATG CTC TGT CAT GAA AAC CTG ATA CGC CAA ACA AAT ACA CAC ATC CGC AGT ACA GGC
      3124      3133      3142      3151      3160      3169

+
K   C   E   E   S   S   T   P   G   T   T   A   A   S   M   P   P   S   D   E
AAG TGT GAG GAG AGC AGC ACC CCA GGA ACC ACC GCA GCC AGC ATG CCC CCG TCT GAC GAA
      3184      3193      3202      3211      3220      3229

TGA CAG GAA GAT TGT TGA AAG CCA TGA GGG AAA AAA TAA ACC CCA GTT CTG AAT CAC CTA
      3244      3253      3262      3271      3280      3289

CCT TCA CCA TCT GTA TAT ACA AAG AAT TCT TCG GAG CTT GTC TTA TTT GCT ATA GAA AAC
      3304      3313      3322      3331      3340      3349

AAT ACA GAG CTT TTG GGA ATG GAA TCA CTG ATT TTC AGT CTT TTC CAT TTC TTT CCT CCT
      3364      3373      3382      3391      3400      3409

AGA ATC TGT GAT CTG AGG GTA TAA AGA CAT TTC CAC CAA GTT TGA GCC CTC AAA ATG TCC
      3424      3433      3442      3451      3460      3469

Polyadenylierungssignal
TGA TTA CAA TGC TGT CTG TCC AAC TGC CTG TTC AAT AAA AGT AAA CTC AGC AGA AAA....
      3484      3493      3502      3511      3520      3529

```

.....Poly(A)-Tail

Es wurden folgende Sequenzkorrekturen durchgeführt:

Ein zusätzliches A in der Position 2510 führt zu einem Frame shift, wodurch drei weitere Inhibitorodomänen entstehen.

Basenaustausche erfolgten an zehn verschiedenen Positionen:

```

Position 551:  G statt A
Position 1207: C statt T
Position 1258: C statt T
Position 1261: C statt T
Position 2175: A statt G
Position 2950: G statt A
Position 3228: C statt T
Position 3284: C statt T
Position 3324: C statt T
Position 3337: C statt T

```


SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forssmann Prof., Wolf-Georg

<120> Serin-Proteinase-Inhibitoren

<130> Forssmann

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1064

<212> PRT

<213> Mamalia

<400> 1

```

Met Lys Ile Ala Thr Val Ser Val Leu Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu
 1           5           10           15

Ile Gln Asp Ala Ala Ser Lys Asn Glu Asp Gln Glu Met Cys His Glu
          20           25           30

Phe Gln Ala Phe Met Lys Asn Gly Lys Leu Phe Cys Pro Gln Asp Lys
          35           40           45

Lys Phe Phe Gln Ser Leu Asp Gly Ile Met Phe Ile Asn Lys Cys Ala
 50           55           60

Thr Cys Lys Met Ile Leu Glu Lys Glu Ala Lys Ser Gln Lys Arg Ala
 65           70           75           80

Arg His Leu Ala Arg Ala Pro Lys Ala Thr Ala Pro Thr Glu Leu Asn
          85           90           95

Cys Asp Asp Phe Lys Lys Gly Glu Arg Asp Gly Asp Phe Ile Cys Pro
          100          105          110

Asp Tyr Tyr Glu Ala Val Cys Gly Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asn
          115          120          125

Arg Cys Ala Leu Cys Ala Glu Asn Ala Lys Thr Gly Ser Gln Ile Gly
          130          135          140

Val Lys Ser Glu Gly Glu Cys Lys Ser Ser Asn Pro Glu Gln Asp Val
          145          150          155          160

Cys Ser Ala Phe Arg Pro Phe Val Arg Asp Gly Arg Leu Gly Cys Thr
          165          170          175

Arg Glu Asn Asp Pro Val Leu Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn
          180          185          190

Lys Cys Ala Met Cys Ala Glu Leu Phe Leu Lys Glu Ala Glu Asn Ala
          195          200          205

```


2.

Lys Arg Glu Gly Glu Thr Arg Ile Arg Arg Asn Ala Glu Lys Asp Phe
 210 215 220
 Cys Lys Glu Tyr Glu Lys Gln Val Arg Asn Gly Arg Leu Phe Cys Thr
 225 230 235 240
 Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Arg Met His Gly Asn
 245 250 255
 Lys Cys Ala Leu Cys Ala Glu Ile Phe Lys Arg Arg Phe Ser Glu Glu
 260 265 270
 Asn Ser Lys Thr Asp Gln Asn Leu Gly Lys Ala Glu Glu Lys Thr Lys
 275 280 285
 Val Lys Arg Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala
 290 295 300
 Lys Asn Gly Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly
 305 310 315 320
 Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Val Tyr
 325 330 335
 Phe Gln Ala Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg
 340 345 350
 Asn Lys Arg Glu Ser Gly Lys Ala Thr Ser Tyr Ala Glu Leu Cys Asn
 355 360 365
 Glu Tyr Arg Lys Leu Val Arg Asn Gly Lys Leu Ala Cys Thr Arg Glu
 370 375 380
 Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys Val His Gly Asn Thr Cys
 385 390 395 400
 Ser Met Cys Glu Val Phe Phe Gln Ala Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys
 405 410 415
 Lys Glu Gly Glu Ser Arg Asn Lys Arg Gln Ser Lys Ser Thr Ala Ser
 420 425 430
 Phe Glu Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Lys Ser Arg Lys Asn Gly Arg
 435 440 445
 Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys
 450 455 460
 Met His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu
 465 470 475 480
 Glu Arg Ala Arg Ala Lys Ala Lys Arg Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys
 485 490 495
 Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg
 500 505 510
 Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Lys
 515 520 525

3

Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys
 530 535 540
 Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg
 545 550 555 560
 Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn
 565 570 575
 Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp
 580 585 590
 Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln
 595 600 605
 Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys
 610 615 620
 Arg Glu Ala Glu Lys Glu Thr Cys Asp Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln
 625 630 635 640
 Asn Gly Lys Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro
 645 650 655
 Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Lys Ala Val Phe
 660 665 670
 Gln Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg
 675 680 685
 Asn Ala Ala Gly His Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln
 690 695 700
 Asp Glu Cys Ala Glu Tyr Gln Glu Gln Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser
 705 710 715 720
 Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr
 725 730 735
 Asn Asn Gln Cys Thr Met Cys Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu
 740 745 750
 Arg Lys Asn Glu Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Asn Gly Thr Gly Ser Glu
 755 760 765
 Ser Gly Lys Asp Thr Cys Asp Glu Phe Arg Ser Gln Met Lys Asn Gly
 770 775 780
 Lys Leu Ile Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly
 785 790 795 800
 Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Thr Met Cys Lys Glu Lys Leu Glu Arg
 805 810 815
 Glu Ala Ala Glu Lys Lys Lys Lys Glu Asp Glu Asp Arg Ser Asn Thr
 820 825 830
 Gly Glu Arg Ser Asn Thr Gly Glu Arg Ser Asn Asp Lys Glu Asp Leu
 835 840 845

4

Cys Arg Glu Phe Arg Ser Met Gln Arg Asn Gly Lys Leu Ile Cys Thr
 850 855 860
 Arg Glu Asn Asn Pro Val Arg Gly Pro Tyr Gly Lys Met His Ile Asn
 865 870 875 880
 Lys Cys Ala Met Cys Gln Ser Ile Phe Asp Arg Glu Ala Asn Glu Arg
 885 890 895
 Lys Lys Lys Asp Glu Glu Lys Ser Ser Ser Lys Pro Ser Asn Asn Ala
 900 905 910
 Lys Asp Glu Cys Ser Glu Phe Arg Asn Tyr Ile Arg Asn Asn Glu Leu
 915 920 925
 Ile Cys Pro Arg Glu Asn Asp Pro Val His Gly Ala Asp Gly Lys Phe
 930 935 940
 Tyr Thr Asn Lys Cys Tyr Met Cys Arg Ala Val Phe Leu Thr Glu Ala
 945 950 955 960
 Leu Glu Arg Ala Lys Leu Gln Glu Lys Pro Ser His Val Arg Ala Ser
 965 970 975
 Gln Glu Glu Asp Ser Pro Asp Ser Phe Ser Ser Leu Asp Ser Glu Met
 980 985 990
 Cys Lys Asp Tyr Arg Val Leu Pro Arg Ile Gly Tyr Leu Cys Pro Lys
 995 1000 1005
 Asp Leu Lys Pro Val Cys Gly Asp Asp Gly Gln Thr Tyr Asn Asn Pro
 1010 1015 1020
 Cys Met Leu Cys His Glu Asn Leu Ile Arg Gln Thr Asn Thr His Ile
 1025 1030 1035 1040
 Arg Ser Thr Gly Lys Cys Glu Glu Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Ala
 1045 1050 1055
 Ala Ser Met Pro Pro Ser Asp Glu
 1060

<210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mamalia

<400> 2
 Ser Ala Phe Arg Pro Phe Val Arg Asp Gly Arg Leu Gly Cys Thr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Asp Pro Val Leu Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys
 20 25 30

Cys Ala Met
 35

5

<210> 3
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mamalia

<400> 3
 Asn Glu Tyr Arg Lys Leu Val Arg Asn Gly Lys Leu Ala Cys Thr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys Val His Gly Asn Thr
 20 25 30
 Cys Ser Met
 35

<210> 4
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mamalia

<400> 4
 Arg Glu Phe Arg Ser Met Gln Arg Asn Gly Lys Leu Ile Cys Thr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Asn Pro Val Arg Gly Pro Tyr Gly Lys Met His Ile Asn Lys
 20 25 30
 Cys Ala Met
 35

<210> 5
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mamalia

<400> 5
 Ser Glu Phe Arg Asn Tyr Ile Arg Asn Asn Glu Leu Ile Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Asp Pro Val His Gly Ala Asp Gly Lys Phe Tyr Thr Asn Lys
 20 25 30
 Cys Tyr Met
 35

<210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Mamalia

6

<400> 6

Lys Asp Tyr Arg Val Leu Pro Arg Ile Gly Tyr Leu Cys Pro Lys Asp
 1 5 10 15

Leu Lys Pro Val Cys Gly Asp Asp Gly Gln Thr Tyr Asn Asn Pro Cys
 20 25 30

Met Leu Cys His Glu Asn Leu Ile Arg Gln Thr Asn Thr His Ile Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Lys
 50

<210> 7

<211> 3528

<212> DNA

<213> Mamalia

<400> 7

tatgcatgga gtggacctgt aggcgacttg catcgtcttc aacatgaaga tagccacagt 60
 gtcagtgcct ctgcccttgg ctctttgcct catacaagat gctgccagta agaatgaaga 120
 tcaggaaatg tgccatgaat ttcaggcatt tatgaaaaat ggaaaactgt tctgtcccca 180
 ggataagaaa ttttttcaaa gtcttgatgg aataatgttc atcaataaat gtgccacgtg 240
 caaaatgata ctggaaaaag aagcaaaatc acagaagagg gccaggcatt tagcaagagc 300
 tcccaaggct actgccccaa cagagctgaa ttgtgatgat tttaaaaaag gagaaagaga 360
 tggggatttt atctgtcctg attattatga agctgtttgt ggcacagatg ggaaaacata 420
 tgacaacaga tgtgcaactgt gtgctgagaa tgcgaaaacc ggggtcccaa ttggtgtaaa 480
 aagtgaaggg gaatgtaaga gcagtaatcc agagcaggat gtatgcagtg cttttcggcc 540
 ctttgttaga gatggaagac ttggatgcac aagggaataat gatcctgttc ttggtcctga 600
 tgggaagacg catggcaata agtgtgcaat gtgtgctgag ctgtttttaa aagaagctga 660
 aaatgccaaag cgagagggtg aaactagaat tcgacgaaat gctgaaaagg atttttgcaa 720
 ggaatatgaa aaacaagtga gaaatggaag gctttttgt acacgggaga gtgatccagt 780
 ccgtggccct gacggcagga tgcattggca caaatgtgcc ctgtgtgctg aaattttcaa 840
 gcggcggttt tcagaggaaa acagtaaaac agatcaaaat ttgggaaaaa ctgaagaaaa 900
 aactaaagt aaagagaaaa ttgtgaaact ctgcagtcaa tatcaaaatc aggcaagaa 960
 tggaatactt ttctgtacca gagaaaatga ccctattcgt ggtccagatg ggaaaatgca 1020
 tggcaacttg tgttccatgt gtcaagtcta cttccaagca gaaaatgaag aaaaagaaaa 1080
 ggctgaagca cgagctagaa acaaaagaga atctggaaaa gcaacctcat atgcagagct 1140
 ttgcaatgaa tatcgaaaagc ttgtgaggaa cggaaaactt gcttgcacca gagagaacga 1200
 tcctatccag ggcccagatg ggaaagtga cggcaacacc tgctccatgt gtgaggtctt 1260
 cttccaagca gaagaagaag aaaagaaaaa gaagggaaggc gaatcaagaa acaaaagaca 1320
 atctaagagt acagcttcct ttgaggagtt gtgtagtga taccgcaaat ccaggaaaaa 1380
 cggacggctt ttttgcacca gagagaatga ccccatccag ggcccagatg ggaaaatgca 1440
 tggcaacacc tgctccatgt gtgaggcctt ctttcaacaa gaagaaagag caagagcaaa 1500
 ggctaaaaga gaagctgcaa aggaaatctg cagtgaattt cgggaccaag tgaggaatgg 1560
 aacacttata tgcaccagg agcataatcc tgtccgtgga ccagatggca aaatgcatgg 1620
 aaacaagtgt gccatgtgtg ccagtgtgtt caaacttgaa gaagaagaga agaaaaatga 1680
 taaagaagaa aaagggaag ttgaggctga aaaagttaag agagaagcag ttcaggagct 1740
 gtgcagtga tatcgtcatt atgtgaggaa tggacgact ccctgtacca gagagaatga 1800
 tcctattgag ggtctagatg ggaaaatcca cggcaacacc tgctccatgt gtgaagcctt 1860
 cttccagcaa gaagcaaaaag aaaaagaaa agctgaaccc agagcaaaaag tcaaaaagaga 1920
 agctgaaaag gagacatgc atgaatttcg gagacttttg caaaatggaa aacttttctg 1980
 cacaagagaa aatgatcctg tgcgtggccc agatggcaag acccatggca acaagtgtgc 2040
 catgtgtaag gcagtcctcc agaaagaaaa tgaggaagaa aagaggaaag aagaggaaag 2100
 tcagagaaat gctgcaggac atggttccag tgggtgggga ggaggaaaca ctcaggacga 2160
 atgtgctgag tatcaggaac aaatgaaaaz tggaagactc agctgtactc gggagagtga 2220


```

tccctgtacgt gatgctgatg gcaaatacgta caacaatcag tgtaccatgt gtaaagcaaa 2280
attggaaaga gaagcagaga gaaaaaatga gtattctcgc tccagatcaa atgggactgg 2340
atcagaatca gggaaggata catgtgatga gtttagaagc caaatgaaaa atggaaaact 2400
tatctgcaact cgagaaagtg accctgtccg ggggccagat ggcaagacac atggtaataa 2460
gtgtactatg tgtaaggaaa aactggaaag ggaagcagct gaaaaaaaaa agaaagagga 2520
tgaagacagg agcaatacag gagaaaggag caatacagga gaaaggagca atgacaaaga 2580
ggatctgtgt cgtgaatttc gaagcatgca gagaaatgga aagcttatct gcaccagaga 2640
aaataaccct gttcgaggcc catatggcaa gatgcacatc aataaatgtg ctatgtgtca 2700
gagcatcttt gatcgagaag ctaatgaaag aaaaaagaaa gatgaagaga aatcaagtag 2760
caagccctca aataatgcaa aggatgagtg cagtgaattt cgaaactata taaggaacaa 2820
tgaactcatc tgccctagag agaatgaccc agtgcacggt gctgatggaa agttctatac 2880
aaacaagtgc tacatgtgca gagctgtctt tctaacagaa gctttggaaa gggcaaagct 2940
tcaagaaaag ccatcccatg ttagagcttc tcaagaggaa gacagcccag actctttcag 3000
ttctctggat tctgagatgt gcaaagacta ccgagtattg cccaggatag gctatctttg 3060
tccaaaggat ttaaagcctg tctgtggtga cgatggccaa acctacaaca atccttgcac 3120
gctctgtcat gaaaacctga tacgccaaac aaatacacac atccgcagta cagggaagtg 3180
tgaggagagc agcaccaccg gaaccaccgc agccagcatg cccccgtctg acgaatgaca 3240
ggaagattgt tgaaagccat gagggaaaaa ataaacccca gttctgaatc acctaccttc 3300
accatctgta tatacaaaga attcttcgga gcttgtctta tttgctatag aaaacaatac 3360
agagcttttg ggaatggaat cactgatttt cagtcttttc catttctttc ctctagaat 3420
ctgtgatctg aggggtataaa gacatttcca ccaagtttga gccctcaaaa tgtcctgatt 3480
acaatgctgt ctgtccaact gcctgttcaa taaaagttaa ctcagcag 3528

```

<210> 8
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Mamalia

```

<400> 8
agtgtcttttc ggccctttgt tagagatgga agacttggat gcacaaggga aaatgatcct 60
gttcttggtc ctgatgggaa gacgcatggc aataagtgtg caatg 105

```

<210> 9
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Mamalia

```

<400> 9
aatgaatata gaaagcttgt gaggaacgga aaacttgctt gcaccagaga gaacgatcct 60
atccagggcc cagatgggaa agtgcacggc aacacctgct ccatg 105

```

<210> 10
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Mamalia

```

<400> 10
cgtgaatttc gaagcatgca gagaaatgga aagcttatct gcaccagaga aaataaccct 60
gttcgaggcc catatggcaa gatgcacatc aataaatgt 99

```

<210> 11
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Mamalia

<400> 11

agtgaatttc gaaactatat aaggaacaat gaactcatct gccctagaga gaatgacca 60
gtgcacggtg ctgatggaaa gttctatata aacaagtgtg acatg 105

<210> 12

<211> 156

<212> DNA

<213> Mamalia

<400> 12

aaagactacc gagtattgcc caggataggc tatctttgtc caaaggattt aaagcctgtc 60
tgtggtgacg atggccaaac ctacaacaat ccttgcatgc tctgtcatga aaacctgata 120
cgccaaacaa atacacacat ccgcagtaca gggaag 156

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04331

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/15 C07K14/81 A61K38/57 A61K48/00 C07K16/38
C12N15/11 G01N33/68 A61K31/70 A61K39/395

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EMBL DATABASES Accession no AJ228139 Sequence reference HSVAKTI 13. Juli 1988 MÄGERT H ET AL: "LEKTI-A novel fifteen-domain type of human serine proteinase inhibitor" XP002131458	1-3
Y	das ganze dokument	4-14
Y	WO 98 46758 A (INCYTE PHARMA INC ;BANDMAN OLGA (US); GUEGLER KARL J (US); SHAH PU) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) das ganze dokument	4-14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 28. Februar 2000	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 10.03.00
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Bevollmächtigter Bediensteter
Telefaxnr.	Telefonnr.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04331

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 99 33974 A (FORSSMANN WOLF GEORG ; KREUTZMANN PETER (DE); MAEGERT HANS JUERGEN) 8. Juli 1999 (1999-07-08) das ganze dokument	1-14
E	WO 99 31117 A (FLORENCE KIMBERLY ; HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); FENG PING (US);) 24. Juni 1999 (1999-06-24) siehe SEQ ID NO 127 seite 9, zeile 25 -seite 12	1-3, 9-11,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

b. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04331

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 7 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. -
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. -
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Der geltenden Patentansprüche 14 bezieht sich auf Produkten/Verbindungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich in der Transcription oder Translation der in den Ansprüchen 1 oder 2 genannten Verbindungen beteiligt sein.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Produkten/Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Antisense Verbindungen

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04331

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846758 A	22-10-1998	US 5851987 A	22-12-1998
		AU 7121898 A	11-11-1998
		EP 0975759 A	02-02-2000
		US 5986064 A	16-11-1999
WO 9933974 A	08-07-1999	DE 19800363 A	15-07-1999
WO 9931117 A	24-06-1999	AU 2306499 A	05-07-1999
		WO 9854963 A	10-12-1998
		AU 1931399 A	05-07-1999
		WO 9931116 A	24-06-1999
		AU 6552198 A	29-09-1998
		EP 0973892 A	26-01-2000
		WO 9840483 A	17-09-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No
PCT/EP 99/04331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/15 C07K14/81 A61K38/57 A61K48/00 C07K16/38
C12N15/11 G01N33/68 A61K31/70 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL DATABASES Accession no AJ228139 Sequence reference HSVAKTI 13 July 1998 MÄGERT H ET AL: "LEKTI-A novel fifteen-domain type of human serine proteinase inhibitor" XP002131458	1-3
Y	the whole document	4-14
Y	WO 98 46758 A (INCYTE PHARMA INC ;BANDMAN OLGA (US); GUEGLER KARL J (US); SHAH PU) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document	4-14
E	WO 99 33974 A (FORSSMANN WOLF GEORG ;KREUTZMANN PETER (DE); MAEGERT HANS JUERGEN) 8 July 1999 (1999-07-08) the whole document	1-14
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2000

Date of mailing of the international search report

10.03.2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No

PCT/EP 99/04331

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>WO 99 31117 A (FLORENCE KIMBERLY ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); FENG PING (US);) 24 June 1999 (1999-06-24) see SEQ ID NO 127 page 9, line 25 -page 12 -----</p>	<p>1-3, 9-11,14</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP99/04331

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although Claim 7 relates to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

Patent claim 14 relates to products/compounds, which are characterized by a desirable peculiarity or property, such as the compounds cited in claims 1 or 2 involved in transcription or translation. Hence, the patent claims include all products, etc. having said peculiarity or property whereas the patent application provides support through the description for only a limited amount of such products, etc. as defined under PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the corresponding support or the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire scope of protection sought for appears to be impossible.

Notwithstanding, the patent claims lack the necessary clarity as required under PCT Article 6, whereby it is sought to define therein the products/compounds through the desired result. This lack of clarity is such that a meaningful search covering the entire scope of protection sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of patent claims that appeared to be clear, supported or disclosed as previously defined, namely those parts relating to the antisense compounds.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04331

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846758 A	22-10-1998	US 5851987 A	22-12-1998
		AU 7121898 A	11-11-1998
		EP 0975759 A	02-02-2000
		US 5986064 A	16-11-1999
-----	-----	-----	-----
WO 9933974 A	08-07-1999	DE 19800363 A	15-07-1999
-----	-----	-----	-----
WO 9931117 A	24-06-1999	AU 2306499 A	05-07-1999
		WO 9854963 A	10-12-1998
		AU 1931399 A	05-07-1999
		WO 9931116 A	24-06-1999
		AU 6552198 A	29-09-1998
		EP 0973892 A	26-01-2000
		WO 9840483 A	17-09-1998
-----	-----	-----	-----

